

Determinación enzimática y metales pesados en cerebro e hígado del modelo ecotoxicológico *Gambusia punctata* (Poeciliidae)

Enzymatic determination and heavy metals in the brain and liver in ecotoxicological model *Gambusia punctata* (Poeciliidae)

MsC. George Argota Pérez y Lic. Yuleidis González Pérez

Laboratorio de Ecotoxicología. Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Se realizó un estudio durante el 2011, con vistas a evaluar los niveles de actividad enzimática y metales pesados bioacumulados en cerebro e hígado de la especie *Gambusia punctata*, que habita en los ecosistemas San Juan y Filé de Santiago de Cuba, para lo cual se seleccionaron 3 estaciones, correspondientes a la parte alta, media y baja de ambos sistemas. Se escogieron ejemplares que midieron biométricamente de 2,1-3,0 cm de longitud total. Se determinó la enzima acetilcolinesterasa en el cerebro y la glutathione-S-transferasa y catalasa, respectivamente, en el hígado. En ambos órganos se analizaron concentraciones de cobre, cinc, plomo y cadmio, tratados por vía húmeda y cuantificados por espectroscopia de plasma inductivamente acoplado con vista axial. En la especie del San Juan, los niveles enzimáticos variaron entre las estaciones, siendo mayores y estadísticamente diferentes para las hembras ($p < 0,05$); sin embargo, en la del Filé, fueron similares entre las partes y sexos. En cuanto a los metales, no se detectaron concentraciones en el cerebro, ni plomo ni cadmio en el hígado. Las concentraciones de cobre y cinc fueron mayores en la parte baja y menores en la alta, de manera que hubo diferencias con respecto a la especie del Filé. Se concluyó que las enzimas variaron desde una estación ambientalmente diferente a otra y que los metales cobre y cinc, a pesar de ser esenciales, representan un riesgo ecotoxicológico en la especie del San Juan, debido a sus elevadas capacidades bioacumulativas.

Palabras claves: determinación enzimática, acetilcolinesterasa, glutathione-S-transferasa, catalasa, metal pesado, *Gambusia punctata*.

ABSTRACT

A study during 2011 was carried out in order to evaluate the levels of enzymatic activity and heavy metals bioaccumulated in brain and liver of the species *Gambusia punctata*, inhabiting San Juan and Filé ecosystems in Santiago de Cuba. For this purpose 3 stations were selected, corresponding to the upper, middle and lower parts of both systems. Specimens biometrically measuring 2.1-3.0 cm in total length were chosen. Acetylcholinesterase enzyme in the brain and glutathione-S-transferase and catalase in the liver were determined, respectively. Copper, zinc, lead and cadmium concentrations were analyzed in both organs, wet processed and quantified by axial

view inductively coupled plasma spectroscopy. In San Juan species the enzymatic levels varied between the stations, being higher and statistically different for females ($p < 0.05$), but in that from Filé they were similar between the parts and genders. Regarding metals, concentrations were not detected in brain, neither lead nor cadmium in the liver. Copper and zinc concentrations were higher in the lower part and lower in the upper one, so that there were differences regarding the Filé species. It was concluded that the enzymes varied from an environmentally different station to another and copper and zinc metals, in spite of being essential, pose an ecotoxicological risk in the San Juan species, due to their high bioaccumulative capabilities.

Key words: enzymatic determination, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase, catalase, heavy metal, *Gambusia punctata*.

INTRODUCCIÓN

El uso y desarrollo de biomarcadores ha cobrado un interés creciente, con el objetivo de evaluar el riesgo de una sustancia o mezcla química potencialmente tóxica, ya que estos constituyen valiosos parámetros o indicadores de la presencia de sustancias exógenas o cambios biológicos como respuestas a distintos xenobióticos.¹ En la actualidad es una responsabilidad urgente aplicar metodologías alternativas para medir y evaluar la calidad química del medioambiente.²

Se plantea que en el campo de la ecotoxicología, los cambios biológicos que ocurren en organismos, poblaciones o comunidades servirán como señales de la posible alteración que está sufriendo un ecosistema, debido a las actividades de origen antropogénico. Así, cada nivel de respuesta biológica, representa una expresión integrada de los niveles de contaminación en un área específica y de esta manera, sirve como indicador del riesgo toxicológico a que una población natural está siendo expuesta.³

En los ecosistemas acuáticos, los peces han sido uno de los primeros en ser utilizados tanto en los protocolos de evaluación como especies centinelas, ya que la característica más importante radica en que están en la cumbre de la cadena trófica y pueden afectar la salud humana, lo cual aumenta su importancia en los estudios ambientales.⁴

En el caso de la *Gambusia punctata*, es una especie de la familia *Poeciliidae* que habita de forma natural en los ríos cubanos, donde además de su control biológico larval, ha indicado la exposición ambiental de elementos tóxicos como son los metales pesados en las aguas.⁵ En general, entre los cambios que ocurren en los peces se encuentran los bioquímicos, como las actividades enzimáticas y la bioacumulación de metales en los tejidos.^{6,7}

El objetivo del presente trabajo fue evaluar niveles de actividad enzimática y metales pesados bioacumulados en cerebro e hígado de la especie *Gambusia punctata* que habita en los ecosistemas San Juan y Filé, ambos en la localidad de Santiago de Cuba.

MÉTODOS

El muestreo se realizó trimestralmente durante el 2011. Fueron seleccionadas únicamente 3 estaciones de muestreo pertenecientes a las partes alta, media y baja tanto del ecosistema San Juan como Filé, este último utilizado como referencia ambiental.⁷

Las estaciones en San Juan se consideraron críticas según la exposición al número de fuentes y la limnología del sistema.

Se muestrearon ejemplares adultos (diferenciación sexual) mediante un jamo profesional (60 x 50 x 45 cm) con luz de malla 0,5 cm. Dichos ejemplares fueron tranquilizados una vez depositados en placas de cristal con hielo para la determinación de biomarcadores. Se analizaron hembras y machos que biométricamente correspondieron al intervalo de clase 2,1-3,0 cm, según la longitud total.

Determinación de biomarcadores

Como biomarcadores de efecto se determinaron las actividades de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) en cerebro, así como la glutatión-S-transferasa y la catalasa en hígado. Como biomarcadores de exposición se establecieron las concentraciones bioacumuladas de cobre (Cu), cinc (Zn), plomo (Pb) y cadmio (Cd) en ambos órganos dianas, respectivamente.

Teniendo en cuenta el tamaño pequeño de los órganos estos fueron tratados individualmente en forma de pool, lo cual garantizó las determinaciones.

- Análisis actividad acetilcolinesterasa

Las muestras fueron homogeneizadas en tampón Tris-HCl 0,1 M, Triton 0,1%, pH 8 en la proporción de 1mL por 0,5 g de tejido y centrifugado a 1000 rpm, durante 12 minutos.⁸

Para la actividad de la AChE cerebral se utilizó como sustrato, acetiltiocolina yodada y la detección de la liberación de tiocolina por reacción con 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico). Después de 5 minutos fue registrada la actividad mediante un espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV/VIS) a 410 nm. La actividad se expresó como $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de tejido y se realizaron todos los análisis por duplicado.

- Análisis glutatión-S-transferasa y catalasa

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en 10 volúmenes de solución buffer 0,1 M de fosfato-K y centrifugados a 14 000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C, para obtener un sobrenadante de glutatión-S-transferasa (GST) y catalasa.

Para determinar la GST se usó como sustrato 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno.⁹ La absorbancia fue registrada a 340 nm.

Para la actividad de la catalasa se estimó la proporción consumida de los niveles de peróxido de hidrógeno.¹⁰ La absorbancia fue determinada a 240 nm y la actividad de la enzima se expresó en $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ proteína de hígado. La concentración de la proteína fue medida en el sobrenadante.¹¹

- Metales pesados

Una vez extraídos ambos órganos fueron colocados en una estufa a 70 °C, durante 48 horas, para su secado total.

Luego se procedió a pesar 2,0 g de cada órgano, triturados y homogeneizados con mortero de ágata.

Para la digestión se pesaron 0,50 g y colocados en un beaker de 50 mL. Se les adicionó 5 mL de una mezcla de ácidos: HClO₄ - H₂SO₄ (7:1) y 15 mL de HNO₃ concentrado.

Fueron calentados en una plancha de calentamiento a 80 °C, hasta la evaporación total de la mezcla de ácidos. Se añadió nuevamente 5 mL de HNO₃ concentrado y se calentó nuevamente hasta la aparición de sales húmedas. Se trasvasó cuantitativamente a un volumétrico de 25 mL con la ayuda de una disolución de 0,7 M de ácido nítrico.

Para la cuantificación de los metales Cu, Zn, Pb y Cd se prepararon las concentraciones de la curva de calibración, para lo cual se utilizaron 2 patrones de referencias certificados internacionalmente, ambos de peces no expuestos a contaminación con metales pesados: *certified values of standard reference material DOLT-3 Dogfish Liver (µg/g dry wt)* y *músculo DORM-2 (dogfish muscle, certificated referente material for trace metals and elemental species)*. Finalmente, se cuantificaron mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado de vista axial (ICP-AES).

Los datos fueron procesados en el programa estadístico *Statgraphis*, versión 5.1 y se utilizó el análisis de varianza ANOVA, para lo cual se seleccionó la prueba de comparación múltiple de medias LSD (mínima diferencia significativa, del inglés *least significant difference*). Las diferencias fueron significativas si $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos de los metales se evaluaron mediante la norma cubana: NC. 38-02-06:1984). Sistemas de normas sanitarias para alimentos. Contaminantes metálicos y otros elementos en alimentos.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra la actividad promedio de la enzima AChE, donde los niveles medidos fueron de forma ascendente entre las estaciones (baja>media>alta), siendo mayores para las hembras, para diferencias significativas ($p < 0,05$). Sin embargo, en la especie del Filé dichos niveles resultaron similares, pero no se encontraron diferencias significativas entre estaciones y sexos; también se aprecian los niveles de concentración de la enzima GST, con diferencias significativas entre las especies y valores más altos para San Juan.

Asimismo, los niveles medidos aumentaron desde la parte alta hacia la baja, muy diferente a lo determinado en la especie del ecosistema Filé. Para la enzima catalasa, los niveles determinados fueron similares entre las estaciones y ecosistemas a la enzima GST.

Tabla 1. Actividad enzimática en cada sexo por ecosistema y estación (acetilcolinesterasa en U/L, glutatión-S-transferasa y catalasa en $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ proteína).

Sexo	Enzimas	San Juan			Filé		
		Alta	Media	Baja	Alta	Media	Baja
Hembra	acetilcolinesterasa	489,47	578,33	633,13	452,43	454,23	455,57
Macho		441,16	545,56	508,38	451,56	452,8	454,26
Hembra	glutatión-S-transferasa	161	165	167	142	143	144
Macho		159	163	166	141	142	142
Hembra	catalasa	38	39	40	36	37	37
Macho		37	38	39	35	35	34

En la tabla 2 se observa que los niveles de metales pesados bioacumulados por sexo y órganos dianas fueron mayores para las hembras. De igual manera, el contenido de metales por estaciones fue de forma descendente: (alta>media>baja), para una diferencia significativa en relación con el valor de referencia ambiental.

Tabla 2. Metales pesados bioacumulados por sexo y órganos dianas (ppm)

Metales	NC	Órganos	Macho				Hembra			
			Alta	Media	Baja	VRA*	Alta	Media	Baja	VRA*
Cu $\pm 0,017$	10,0	hígado	33,21	40,13	42,29	24,2	38,28	41,33	44,57	24,8
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zn $\pm 0,045$	50,0	hígado	73,15	76,34	79,19	53,21	72,77	75,24	79,46	53,30
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pb $\pm 0,004$	1,0	hígado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd $\pm 0,012$	0,05	hígado	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		cerebro	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Leyenda: valor de incertidumbre: (\pm)

Norma cubana (NC)

Valor de referencia ambiental (VRA): especie Filé

No detectado: (ND)

* Diferencias significativas ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

La selección y monitoreo con organismos naturales es fundamental para expresar en términos cualitativos y cuantitativos los cambios biológicos que ocurren en el tiempo, ocasionado por las variaciones ambientales. Según la posición evolutiva que ocupan las especies y los daños biológicos que se hallan tanto por homología como por analogía en órganos dianas, pueden predecir los niveles de riesgo que pudieran aparecer igualmente en humanos, máxime cuando este hace uso de los ecosistemas.

En esta investigación, se determinaron por primera vez en su medio natural, de forma comparativa y en la misma especie, niveles enzimáticos de acetilcolinesterasa, glutatión-S-transferasa y catalasa. En el caso de la primera, determinada en el cerebro, se observó que los niveles mayores correspondieron a la especie que habita en el ecosistema San Juan.

Al respecto, en un estudio realizado en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), se encontró que esta enzima puede ser alterada ante la exposición a metales, principalmente si algunos de ellos, como el Pb, tienen acciones en órganos dianas.¹²

Otros autores refieren que la actividad de AChE en humanos se ha incrementado en meningiomas, astrocitomas y tumores de glioblastoma y su patrón de isoformas es diferente al de tejido sano. Igualmente, observaron alteraciones en la expresión de la AChE en diferentes tumores, amplificación de genes de AChE en leucemias, tumores de ovario y en la agresividad de astrocitomas, lo cual evidencia su participación en la tumorigénesis, de manera que estos estudios sugieren que la AChE está involucrada en la regulación del ciclo celular.¹³

La mayoría de los estudios han enfocado su actividad en la hidrólisis de la AChE, aunque se ha expresado que esta enzima no está restringida solo al sistema nervioso y parece tener diferentes funciones, debido a que está presente tanto en bacterias como plantas y en las que se piensa puede funcionar como un factor trófico. Las proteínas, con dominio de colinesterasas, parecen ser el resultado de duplicaciones de un gen ancestral de AChE, dado que la comparación de la secuencia del dominio catalítico y del no catalítico sugiere que en estos genes la actividad enzimática pudo perderse en varias etapas independientes durante la evolución.¹⁴

Por su parte, las enzimas determinadas en el hígado presentaron diferencias en sus niveles entre los 2 ecosistemas. Se observó que los valores en el Filé fueron muy similares entre las estaciones y sexos, no así en la especie del San Juan, lo cual evidencia que cuando el medio es variable ambientalmente, las actividades de estas enzimas responden proporcionalmente, lo cual coincide con otros informes.¹⁵

Asimismo, se ha encontrado que en el pez *Colossoma macropomum*, proteínas como tioredoxinas, metalotianinas, péptidos, así como péptido glutatión rico en grupos tioles, aumentan su expresión en presencia de metales.¹⁶ Algunos autores también han expresado que la presencia de metales pesados incrementan la enzima catalasa, incluso hasta en las plantas.¹⁷

En cuanto a las concentraciones de los metales, la especie del San Juan presentó los valores más elevados, lo cual coincide con los resultados obtenidos previamente en la propia especie y en el mismo ecosistema.⁵

En los ambientes acuáticos, las excesivas concentraciones de metales afectan a los organismos de diferentes maneras. Pueden disminuir su metabolismo y crecimiento y hasta ocasionar la muerte celular, ya que esta última puede ocurrir por asfixia, debido a la coagulación de las mucosidades sobre las branquias.¹⁸

A pesar de que las concentraciones de Pb y Cd estuvieron por debajo del límite de detección del método analítico, fue significativo que elementos esenciales como el Cu y Zn se encontraran en concentraciones muy elevadas, donde al ser comparados con el valor referenciado resultaron muy superiores, lo cual indica que la probabilidad de toxicidad está presente, dado el factor de bioacumulación.

Se ha observado que en los sistemas acuáticos la toxicidad del Cu aumenta cuando disminuye la dureza del agua y el oxígeno disuelto. Asimismo, decrece la toxicidad en presencia de agentes quelatantes, ácidos húmicos y sólidos en suspensión, esenciales para atrapar metales.¹⁹ De la misma manera, otros efectos negativos en peces por el exceso de Cu, están dados por estrés oxidativo y nocividad sobre las branquias, así como en el transporte de iones Na⁺ debido a la inhibición de la enzima Na⁺/K⁺-ATPasa.²⁰

Para el caso del Zn, se plantea que en los organismos acuáticos, es mayor para valores bajos de pH, contenido de oxígeno disuelto y temperaturas elevadas. En estas condiciones se producen daños en las células epiteliales de las branquias que pueden ocasionar la muerte. A nivel bioquímico, la intoxicación por Zn disminuye significativamente el contenido de glucógeno, proteína y lípidos en los tejidos, unido a la disminución del valor calorífico, afecta el valor nutritivo de los peces y es el hígado el tejido más afectado. Todo lo anterior aumenta la tasa metabólica de los peces.

Finalmente, las enzimas variaron desde una estación ambientalmente diferente a otra y los metales Cu y Zn, a pesar de ser esenciales, representan un riesgo ecotoxicológico en la especie del San Juan, debido a sus elevadas capacidades bioacumulativas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo agradecen el valioso intercambio científico con especialistas en ecotoxicología, pertenecientes a los centros siguientes: Universidad "Federico Villarreal" de Lima, Perú; Universidad Nacional de la República en Montevideo, Uruguay; Universidad Nacional de Buenos Aires; Universidad de Oriente y Centro de Ecología de Guayacán, Sucre (Venezuela), los cuales asistieron al X Congreso Latinoamericano de Toxicología y Química Ambiental (SETAC - LA) y al I Congreso Venezolano de Ecotoxicología, celebrado en la ciudad de Cumaná, Estado de Sucre, Venezuela 2011.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. West DW, Ling N, Hicks BJ, Tremblay LA, Kim ND, Van den Heuvel MR. Cumulative impacts assessment along a large river, using brown bullhead catfish (*Ameiurus nebulosus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006; 25(7): 1868-80.

2. Bozzetti M, Schulz UH. An index of biotic integrity based on fish assemblages for subtropical streams in southern Brazil. *Hydrobiologia*. 2004; 529(1-3): 133-44.
3. Orrego R, Moraga CG, González M, Barra R, Valenzuela A, Burgos A, Gavilán JF. Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environ Toxicol Chem*. 2005; 24(8):1935-43.
4. Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta*. 2008; 606(2); 135-50.
5. Argota PG, Argota CH. Evaluación ambiental del río San Juan de Santiago de Cuba por exposición bioacumulativa a metales pesados. *MEDISAN*. 2012 [citado 10 Sep 2012]; 16(8). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000800003
6. Ahmad I, Pacheco M, Santos MA. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004; 57(3): 290-302.
7. Argota PG, Argota CH, Larramendi GD, Mora TY, Fimia DR, Iannacone OJ. Histología y química umbral de metales pesados en hígado, branquias y cerebro de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) del río Filé de Santiago de Cuba. *Rev Electrón Vet*. 2012 [citado 10 Sep 2012]; 13(05B). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050512B/011ATM08.pdf>
8. Ellman GL, Courtney KD. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7: 88-95.
9. Keen JH, William BJ. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. *J Biol Chem*. 1976; 20: 6183-8.
10. Beutler E. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton; 1984.
11. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (). Protein measurements with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
12. Camacho SMI. Bioconcentración y toxicidad de metales en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Rev Toxicol*. 2007; 24:14-7.
13. Vidal CJ. Expression of cholinesterases in brain and non brain tumor. *Chem Biol Interact*. 2005; 157-158: 227-32.
14. Meshorer E, Soreq H. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci* 29 (4): 216-224. guanylate kinases. *J Biol Chem*. 2006; 278: 6873-8.
15. Camargo MM, Martínez CB. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2006; 21: 61-9.

16. Salazar LR, Pérez R, León A, Lemus M, Rojas L. Determinación de tioles totales y tioles solubles en ácido en el pez *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818) expuesto a cadmio. Rev Cient (Maracaibo). 2009; 19(4):414-20.
17. Odjegba VJ, Fasidi IO. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. Rev Biol Trop. 2007; 55(3-4): 815-23.
18. Robles CA, Pérez R, Vázquez ML, Sánchez JG, Aguirre G. Variabilidad espacio-temporal de metales pesados en camarones, agua y sedimentos de la laguna Madre, Tamaulipas; 2008 [citado 24 Jul 2012]. Disponible en: <http://www.turevista.vat.edu.mx/vol203%20num%202>
19. Armendáriz SN, Aquino TM, Romero OL, Sánchez VM, Sobrino F, Miranda AM. Evaluación de los parámetros bioquímicos en tres macrofitas acuáticas expuestas a cobre. Polibotánica. 2008; 26: 149-58.
20. Grosell M, McDonald MD, Walsh PJ, Wood CM. Effects of prolonged exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na⁺/K⁺-ATPase activity in osmoregulatory tissues. Aquat Toxicol. 2004; 68: 263-75.

Recibido: 30 septiembre 2012.

Aprobado: 5 de octubre de 2012.

George Argota Pérez. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Autopista Nacional, km 1 ½, Santiago de Cuba, Cuba. Correo electrónico: george@toxi.scu.sld.cu